

组织及血液一氧化氮合成酶（NOS）活性检测试剂盒

说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA9-C48	组织及血液一氧化氮合成酶（NOS）试剂盒	48T	常量法

产品说明:

一氧化氮合成酶（Nitric Oxide Synthase，NOS，EC 1.14.13.39）是生物体内催化L-精氨酸合成NO的一类酶，主要存在于血管平滑肌、巨噬细胞、内皮细胞、神经细胞、肝细胞、肾小球膜细胞等各种细胞中。NO作为细胞信息分子，在神经系统、免疫系统和心血管系统中起着重要的调节作用。

NOS催化L-精氨酸、分子氧和NADPH，生成NO和NADP⁺，NO在水溶液中极易氧化生成NO₂和NO₃⁻。在酸性条件下，NO₂与重氮盐磺酰胺生成重氮化合物，进一步与萘基乙烯基二胺偶合，产物在550nm处有特征吸收峰，测定其吸光值，可以计算得到NOS活性大小。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	-20℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×2 支	-20℃保存
缓冲液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 50 μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂六	液体 2.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	液体 55 μL×1 支	2-8℃保存
显色液A 液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
显色液B 液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制:

1. 提取液二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
2. 试剂二：试剂放于瓶内玻璃瓶中，临用前取 1 瓶加入6mL 缓冲液，-20℃分装可保存4 周，避免反复冻融；
3. 试剂三工作液：临用前根据样本量按试剂三：缓冲液=4μL：396μL（400μL，5T）的比例配制，现用现配；

4. 试剂四：临用前取 1 支试剂四加入 0.6mL 缓冲液，-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融；
5. 试剂五：试剂放于瓶内玻璃瓶中，临用前取 1 支试剂五加入 2.4mL 缓冲液，-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融；
6. 工作液：临用前根据样本数量按照试剂一：试剂二：试剂三工作液：试剂四：试剂五 = 0.6mL：1.0mL：0.4mL：0.1mL：0.4mL（2.5mL，5T）的比例配制工作液，现用现配；
7. 试剂七工作液：临用前根据样本量按试剂七：缓冲液 = 10μL：450μL（0.46mL，约 11T）的比例配制，现用现配；
8. 显色液：临用前根据样本数量按照显色液 A 液：显色液 B 液 = 1:1 充分混匀，现配现用；
9. 标准品：10μmol/mL 亚硝酸钠。临用前取 5μL 10μmol/mL 亚硝酸钠标准液，加入 995μL 蒸馏水，配制成 0.05μmol/mL 亚硝酸钠标准液，现配现用。

注：试剂二、试剂四、试剂五为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同。

操作步骤：

一、样本处理

1. 组织样本：建议称取 0.2g 样本，加入 0.98mL 提取液一和 0.02mL 提取液二，冰浴匀浆后，于 4℃，12000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
2. 细菌/细胞样本：建议 1000 万细菌/细胞加入 0.98mL 提取液一和 0.02mL 提取液二，冰浴超声破碎（功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 5min），然后于 4℃，12000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
3. 液体样本：直接测定。若液体有浑浊则离心取上清测定。

注：可根据样本量将提取液一和提取液二按照 0.98mL：0.02mL 的比例混匀后进行样本前处理。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 550nm，蒸馏水调零。
2. 在 2mL EP 管按下表顺序加样：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	240	-	-
工作液	500	-	-
混匀，37℃反应 60min，沸水浴 5min（扣紧盖子），冷却后 4℃，11000g 离心 10min，取全部上清于一个新 EP 管中			
上清液	全部上清液	-	-
试剂六	40	-	-
试剂七工作液	40	-	-

混匀，37℃反应30min		-	-
标准液	-	240	-
蒸馏水	-	580	820
显色液	400	400	400

混匀，常温静置10min，取1mL反应液于1mL玻璃比色皿中测定550nm处各管吸光值，分别记为A测定、A标准和A空白，计算 $\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$ 。空白管和标准管只需测1-2次。

三、NOS 活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

NOS活性 (U/mg prot) = $(\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (C_{pr} \times V_{样}) \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F$

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

NOS活性 (U/g 质量) = $(\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F$

3. 按细菌/细胞数目计算

单位的定义：每 10^6 个细菌/细胞每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

NOS活性 (U/ 10^6 cell) = $(\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div (N \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div N \times F$

4. 按液体体积计算

单位的定义：每mL液体每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

NOS活性 (U/mL) = $(\Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times C_{标准}) \times V_{样} \div V_{样} \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times F$

C标准：0.05 μ mol/mL；V样：反应体系中加入的样本体积，0.24mL；V样总：加入的提取液一和提取液二的总体积，1mL；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数目，以 10^6 计； 10^3 ：单位换算系数，1 μ mol=10³nmol；T：反应时间，60min；F：样本稀释倍数。

注意事项：

1. NOS 稳定性差，易变性失活，建议使用新鲜样本实验，如果不立即进行实验，样本需-20℃保存。
2. 试剂二配制好后，建议根据样本量取出所需试剂二，剩余试剂二需尽快置于-20℃保存。
3. 如果 ΔA 测定小于0.005 或测定管吸光值接近空白管，可以增加样本量或者延长第一步37℃反应时间后再进行测定；如果 ΔA 测定大于0.4，建议将样本匀浆后的上清液用缓冲液适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。